

ALESSANDRA FERREIRA RIBAS

**ESTUDOS SOBRE CULTURA DE TECIDOS
DO MARACUJAZEIRO AMARELO**

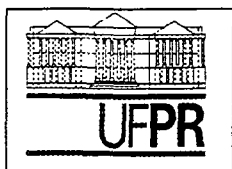
(Passiflora edulis f. flavicarpa DEG.)

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-
Graduação em Agronomia - Produção Vegetal,
Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal
do Paraná.

Orientador: Dr. Ricardo Antonio Ayub

CURITIBA

2000



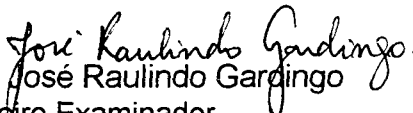
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

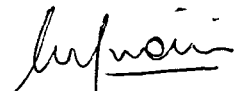
PARECER

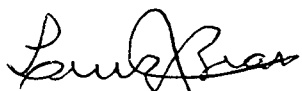
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **ALESSANDRA FERREIRA RIBAS**, sob o título "**ESTUDOS SOBRE A CULTURA DE TECIDOS DO MARACUJAZEIRO AMARELO (*Passiflora edulis f. flavicarpa* DEG.)**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.


Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 17 de março de 2000.


Professor Dr. José Raulindo Gardingo
Primeiro Examinador


Professora Dra. Marguerite Quoirin
Segunda Examinadora


Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Terceiro Examinador


Professor Dr. Ricardo Antonio Ayub
Presidente da Banca e Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao curso de pós-graduação em Agronomia - Produção Vegetal da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realizar este mestrado.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub, pela orientação, e pela oportunidade de realizar este mestrado.

A Profa Dra Marguerite Quoirin, pela co-orientação e pelas sugestões prestadas.

Ao Prof. Dr. José Raulindo Gardingo, pela orientação na área de citogenética e análises estatísticas dos resultados.

A pesquisadora Neuza Maria C. Stenzel do Instituto Agrônomo do Paraná - Londrina, pela doação das mudas e sementes de maracujá amarelo.

Ao Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade da Universidade Estadual de Ponta Grossa, por permitir a realização deste trabalho.

A todas as estagiárias e ao laboratorista Wilson Padilha do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pelo apoio.

A Bibliotecária da UEPG, Angela Maria de Oliveira pelos auxílios prestados.

Aos colegas do Curso, pela amizade.

Aos meus familiares pelo apoio e pela compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 CULTURA DE TECIDOS DE MARACUJAZEIRO.....	3
2.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES <i>IN VITRO</i> DE MARACUJAZEIRO.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 CULTURA DE TECIDOS COM MATERIAL ADULTO DE MARACUJAZEIRO AMARELO.....	10
3.1.1 Ensaios de regeneração de brotos.....	10
3.1.1.1 Material Vegetal.....	10
3.1.1.2 Preparo dos explantes.....	11
3.1.1.3 Desinfestação.....	11
3.1.1.4 Meios de cultura.....	11
3.1.2 Ensaio de microestaquia.....	12
3.1.2.1 Meios de cultura e tratamento hormonal.....	13
3.2 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE MARACUJAZEIRO AMARELO.....	13

3.3 CULTURA DE TECIDOS COM MATERIAIS JUVENIS DE MARACUJAZEIRO AMARELO.....	15
3.3.1 Ensaios de regeneração de brotos.....	15
3.3.1.1 Material Vegetal.....	15
3.3.1.2 Preparo dos Explantes	15
3.3.1.3 Meios de Cultura.....	16
3.3.1.4 Enraizamento.....	17
3.3.1.5 Aclimação.....	18
3.3.1.6. Citologia.....	18
3.3.2 Ensaios de microestaquia.....	19
3.3.2.1 Preparo das microestacas.....	19
3.3.2.2 Meios de Cultura.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 CULTURA DE TECIDOS COM MATERIAL ADULTO DE MARACUJAZEIRO AMARELO.....	21
4.1.1 ENSAIOS DE REGENERAÇÃO.....	21
4.1.2 ENSAIOS DE MICROESTAQUIA.....	22
4.2 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE MARACUJAZEIRO AMARELO.....	24
4.3 CULTURA DE TECIDOS COM MATERIAIS JUVENIS DE MARACUJAZEIRO AMARELO.....	27
4.3.1 Regeneração de brotos.....	27
4.3.1.1 Alongamento e Enraizamento.....	30
4.3.1.2 Transplante e Aclimação.....	32
4.3.1.3 Citologia.....	33
4.3.2 Ensaio de microestaquia.....	34

5 CONCLUSÕES.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA - ácido 3 indolacético

AIB - ácido indolbutírico

ANA - ácido naftalenoacético

B5 - meio de cultura (GAMBORG et al., 1968)

BA - 6-benziladenina

BAP - 6-benzilaminopurina

CIN - cinetina, 6-furfurilamino purina

HCl - ácido clorídrico

2iP - isopenteniladenina

MS - meio de cultura (MURASHIGE e SKOOG, 1962)

MS/2 - meio de cultura, diluído a metade (MURASHIGE e SKOOG, 1962)

MSB5 - sais do meio MS e vitaminas do meio B5

MSB5/2 - sais do meio MS e vitaminas do meio B5 diluídos a metade

NaOH - hidróxido de sódio

RAS - Regras para análise de sementes

v/v - (volume/volume) concentração

LISTA DE TABELAS

1. PROCEDÊNCIA DOS ACESSOS DA MARACUJÁ - AMARELO TESTADOS NOS ENSAIOS DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS ADULTAS.....	10
2. COMPOSIÇÃO DOS COMPLEXOS VITAMÍNICOS MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) E B ₅ (GAMBORG, et al., 1968).....	17
3. EFEITO DO COMPLEXO VITAMÍNICO SOBRE A PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM GEMAS E O NÚMERO MÉDIO DE GEMAS DE MARACUJAZEIRO AMARELO (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg.) POR EXPLANTE, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM DIFERENTES MEIOS.....	28
4. NÚMERO DE FOLHAS E RAÍZES PRODUZIDAS PELAS MICROESTACAS DO MARACUJAZEIRO AMARELO (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg.), APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....	35

LISTA DE FIGURAS

1. PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE MARACUJAZEIRO AMARELO SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS, APÓS 18 DIAS.....	26
2. CULTURA DE TECIDOS A PARTIR DE PLANTA ADULTA DE MARACUJÁ-AMARELO COM 6 MESES DE IDADE. A) PLANTAS MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO; B) ENSAIOS DE REGENERAÇÃO A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES; C) MICROESTAQUIA DE MATERIAL ADULTO EM MEIO MS/2 SEM AUXINA; D) ENRAIZAMENTO DAS MICROESTACAS EM MEIO MS/2 COM 3 mg/L ⁻¹ E 0,5 mg/L ⁻¹ DE ANA.....	46
3. CULTURA DE TECIDOS DE MATERIAL JUVENIL DE MARACUJÁ - AMARELO. A) SEQÜÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE GEMAS <i>IN VITRO</i> EM MEIO COM SAIS MS, COMPLEXO VITAMÍNICO B ₅ E 2 mg/L ⁻¹ DE BAP; B) DETALHE DAS PLÂNTULAS REGENERADAS, RAÍZES EM DESENVOLVIMENTO EM MEIO MS/2; C) PLANTAS ACLIMATADAS EM SUBSTRATO COMPOSTO POR 1:1 SOLO E VERMICULITA.....	47
4. MICROESTAQUIA COM MATERIAL JUVENIL DE MARACUJÁ - AMARELO. A) MICROESTACAS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS; B) ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO EM MEIO MS; C) MICROESTACAS ACLIMATADAS EM SUBSTRATO COMPOSTO POR 1:1 SOLO E VERMICULITA.....	48

RESUMO

Com o objetivo de estudar as técnicas de propagação vegetativa *in vitro* do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) vários ensaios foram propostos. Iniciou-se com o cultivo de explantes foliares e microestacas de material adulto. Foi utilizado o meio de cultura MS com várias concentrações de BAP: 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0; 2,5; 3 mg.L⁻¹ e o acesso '156 x 180' de maracujazeiro, para realizar regeneração de gemas adventícias. Determinou-se a concentração de 2 mg.L⁻¹, a qual foi testada para os demais acessos. A porcentagem de explantes com gemas ocorreu na seguinte proporção: '156 x 123' - 64%; '156 x 180' - 40%; '352' - 30%; ('156 x 123') x ('118 x 204') - 28%; '309' - 0%. Porém, as gemas formadas eram pequenas, não alongaram e tornaram-se cloróticas. Na microestaquia com material adulto, foram testados meios com e sem auxinas, o enraizamento foi obtido com AIB 3 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ de ANA na proporção de 60% para o acesso '352'; 40% para '309' e ('156 x 123') x ('118 x 204'); 20% para - '156 x 123' e '156 x 180', porém não houve desenvolvimento da parte aérea. Realizou-se também ensaios de germinação de sementes *in vitro* de maracujá amarelo. Para estes ensaios foram avaliados os efeitos de diferentes substratos e temperaturas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com esquema fatorial (3 x 3) e três repetições. Avaliou-se a porcentagem de germinação após 18 dias. O melhor resultado foi obtido com o tratamento de pré-embebição das sementes por 48 horas e o regime de temperaturas alternadas de 23-30° C em substrato de algodão (86,7%). Foi avaliado também o efeito de diferentes complexos vitamínicos na regeneração *in vitro* do maracujá, utilizando folhas cotiledonares. Quatro tratamentos foram testados. Dois testaram o complexo vitamínico MS, e outros dois testaram o complexo vitamínico do meio B₅, ambos suplementados com 1 e 2 mg.L⁻¹ de BAP. Os meios foram solidificados com 2,6 g.L⁻¹ de Phytigel. Cada ensaio foi constituído de 10 placas de petri, totalizando 60 explantes por meio de cultura testado. Plântulas *in vitro* foram utilizadas para um ensaio de microestaquia sendo 10 tubos de ensaio com meio e vitaminas MS e 10 tubos com meio MS com vitaminas do complexo B₅, com 1 microestaca em cada. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A regeneração de plantas ocorreu via organogênese direta. Meios suplementados com complexo vitamínico B₅ demonstraram aumento na capacidade regenerativa de maracujazeiro amarelo em ambas as doses de fitorreguladores, tanto em relação ao número de explantes com gemas, quanto ao número de gemas por explante. O enraizamento dos brotos regenerados variou de 80-93%. A fase de aclimação ocorreu sem perdas. As microestacas desenvolveram-se e enraizaram sem a necessidade da adição de fitorreguladores aos meios de cultura. Não houve diferenças significativas entre os resultados deste ensaio. O número de cromossomos das plantas regeneradas foi determinado pelo método de Feulgen. As plantas regeneradas apresentaram 2n=18 cromossomos.

ABSTRACT

With the aim of study the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg). *in vitro* vegetative technical propagation several assays were proposed. Started with culture of adult material. Was used the MS medium with several concentrations of BAP: 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg.L⁻¹ and the access '156 x 180' to determine the concentration to be used. Was determined the concentration of 2 mg.L⁻¹ of BAP to test the others access. The percentage of explants with bugs occurred in the following proportion: '156 x 123' - 64%; '156 x 180' - 40%; '352' - 30%; ('156 x 123') x ('118 x 204') - 28%; '309' - 0%, however the buds formed were small, isolated and no elongation. On microcuttings of adult material, were tested medium with and without auxin, the microcuttings rooted was obtained with MS/2 medium, 3 mg.L⁻¹ of IBA and 0,5 mg.L⁻¹ NAA on proportion of: '352' - 60%; '309' and ('156 x 123') x ('118 x 204') - 40%; '156 x 123' and '156 x 180' - 20%, however, as there weren't obtained microcuttings development, news assays were proposed with juvenile material, initiate with *in vitro* seeds germination. To this assays were evaluated the effects of different substrate and temperature on germination of yellow passion fruit seeds. The experiment design used was the completely randomized with factorial scheme (3 x 3) with nine treatment and three replications. The *in vitro* germination could be found at 18 th day, was evaluated. The highest germination rate was obtained for treatment pre-soaked by 48 hours, alternate temperature ranging 23 -30⁰ C and substrate consisting of cotton (86,7 %). Cotyledonary leaves no expanded were used as explant with to test the effect of different vitaminic complex on yellow passion fruit *in vitro* regeneration. Four medium were tested, supplemented with BAP cytokinin. Two assays tested the MS salts and vitaminic complex and others two tested the MS salts and B5 vitaminic complex both supplemented with 1 and 2 mg.L⁻¹ of BAP. The medium were solidified with 2,6 g.L⁻¹ Phytigel. Each assay was constituted by 10 petri plates with 6 explants / plate. The plantlets *in vitro* were used as microcuttings; were tested 10 test tubes with total MS medium and 10 with the salts MS and vitaminic complex B5, with 1 microcutting in each tube. The average were compared by Tukey's test with 5% of probability. Plant regeneration occurred by direct organogenesis. Medium supplemented with B5 vitaminic complex shown increase on capacity of yellow passion fruit regeneration in both growth regulator concentration, as on relation of explant number with buds as number of buds per explant. The rooting of regenerated shoots ranged 80-93%. The phase of acclimation occurred without damages. The microcuttings have developed itself and rooting without necessity of growth regulators, there wasn't significative differences in this assay. The number of chromosome was determined by Feulgen's method. Regenerated plants shown 2n=18 chromosomes.

1 INTRODUÇÃO

O maracujá pertence à família Passifloraceae da ordem Passiflorales, que compreende 12 gêneros, incluindo 580 espécies, com distribuição principalmente nos trópicos, nas Américas, Ásia e África, das quais mais de 150 são nativas do Brasil e 60 produzem frutos aproveitáveis (OLIVEIRA, 1987; TEIXEIRA, 1994). *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. é a espécie cultivada mais importante, conhecida como maracujá amarelo ou azedo, destinada ao abastecimento das indústrias processadoras da fruta ou comercialização in natura (SÃO JOSÉ, 1994).

Os métodos convencionais de propagação do maracujazeiro são feitos por sementeira, estaca, mergulhia e enxertia. A multiplicação por sementes é a maneira usual para o estabelecimento de plantações comerciais de maracujá, embora se saiba que dela resulta uma grande variabilidade genética na descendência (RUGGIERO, 1987). As técnicas de cultura in vitro oferecem uma boa alternativa, pois podem produzir em grande escala clones selecionados de variedades com interesse comercial (FREITAS, 1997). Estas técnicas tem sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. A incorporação de genes via transformação genética depende da cultura de células, tecidos ou órgãos para a regeneração de plantas in vitro, mesmo quando a transformação se procede por meio da biobalística (FERREIRA et al., 1998).

Considerando o elevado grau de alogamia da espécie que é favorecida por características florais que beneficiam a polinização cruzada, cuja variabilidade genética reflete nas respostas morfogênicas *in vitro*, a transformação de plantas e a regeneração via cultura de

tecidos, constituem-se numa importante forma de melhoramento genético desse importante gênero (SILVA, 1998). O objetivo geral deste trabalho foi estudar o cultivo *in vitro* do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). Os objetivos específicos foram: determinar o substrato e a temperatura ideal para germinação *in vitro* de sementes de maracujá amarelo; testar vários meios de cultura na indução de organogênese e na multiplicação por microestaquia em material adulto e juvenil de maracujazeiro amarelo; iniciar a avaliação da estabilidade cromossômica das plantas produzidas por cultura de tecidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DE TECIDOS DE MARACUJAZEIRO

Cultura de tecidos é a ciência que estuda o crescimento de células, tecidos ou órgãos de plantas, sob meio artificial (GEORGE, 1993).

A propagação clonal *in vitro* em *Passiflora* foi primeiramente descrita por NAKAYAMA (1966), utilizando a espécie *P. caerulea*, por meio da proliferação de gemas axilares. No caso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, a multiplicação vegetativa de gemas axilares foi obtida inicialmente por MORAN ROBLES (1978). Duas fases foram necessárias para o estabelecimento das culturas. Os melhores resultados foram obtidos em presença de cinetina, sendo os explantes em seguida transferidos para meio contendo AIA. Já para a espécie *P. molissima* a presença de cinetina foi suficiente.

Há vários exemplos na literatura da proliferação de gemas axilares (DREW, 1991). Múltiplos brotos foram desenvolvidos por ramificação axilar quando ápices caulinares foram cultivados em presença de BA (FARIA e SEGURA, 1997b). Anteriormente esta técnica já havia sido relatada para várias espécies de maracujá (*P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis*, *P. alata*, *P. caerulea*, *P. mollissima*, *P. coccinea*, *P. herbertiana*, *P. suberosa*) utilizando uma combinação hormonal com cinetina, BA e AIA (DREW, 1991). Recentemente, KOCK (1999) também obteve regeneração de plantas *in vitro* da espécie *P. actinea*.

Em maracujazeiro, a adição apenas de citocinina ao meio de cultura geralmente promove a resposta esperada de regeneração de gemas (SCORZA e JANICK, 1976), provavelmente pela quantidade endógena de auxina no explante ser suficiente para estabelecer o equilíbrio necessário a diferenciação (MORAN ROBLES, 1979). O trabalho de DORNELAS e VIEIRA (1994) reforça esta hipótese, pois a adição de 1 mg.L^{-1} de ANA inibiu a regeneração de brotos mesmo em meio contendo 4 mg.L^{-1} de BAP.

As citocininas são compostos derivados de adenina que promovem a citocinese (divisão celular) em tecidos cultivados *in vitro* (SALISBURY e ROSS, 1992). Das citocininas comercialmente disponíveis a BAP é a que, em geral, apresenta melhores resultados. A adição de fitorreguladores aos meios de cultura tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz e orientar a morfogênese ou organogênese dos tecidos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Observações anatômicas indicam que o BAP exerce efeitos organogenéticos nos internódios de caule, enquanto as células estão em estágios iniciais de proliferação celular na ausência de zonas meristemáticas organizadas. Células neste estágio aparentemente não organizado devem ser capazes de receber e reagir ao sinal do BAP (SCORZA e JANICK, 1980).

A organogênese direta é facilmente induzida em entrenós e segmentos de gavinha de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) em meio MS na presença de BAP e as gemas regeneradas podem ser utilizadas em seguida para a multiplicação de plantas (GRATTAPAGLIA et al., 1991). Esta técnica de formação de órgãos refere-se ao surgimento de gemas adventícias ou raízes, desenvolvidas a partir de massas de células que apresentam

potencial morfogênético na planta in vivo, mas que em geral não se expressa (HARTMAN et al., 1990; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Em Passifloraceae, materiais juvenis são usualmente utilizados para micropropagação (SCORZA e JANICK, 1980; KANTHARAJAH e DODD, 1990; DORNELAS e VIEIRA, 1994; KOCH, 1999). Entretanto, tecidos jovens estão disponíveis por um período relativamente curto de tempo e/ou em quantidade limitada (VAQUERO et al., 1993 citados por KAWATA et al., 1995). Baseado nestas observações estes autores desenvolveram um protocolo para subcultivos múltiplos de brotos primários por longo tempo (mais de três anos), os quais mantiveram a capacidade para regenerar plantas de morfologia estável.

A formação de órgãos adventícios já foi observada em vários tipos de explantes como segmentos de folhas, internódios, cotilédones, hipocótilos, gavinhas, na forma direta (VESTRI et al., 1990; DORNELAS e VIEIRA, 1994; BIASI et al., 2000) e indireta, quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calos (VESTRI et al., 1990; D'UTRA VAZ et al., 1993; DORNELAS e VIEIRA, 1993; BIASI et al., 2000). Gemas adventícias são aquelas originadas em locais diferentes daqueles onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Estas gemas são desejáveis como sistema de multiplicação, desde que a formação de calo seja mínima ou nula. Ao se utilizar explantes de folhas, partes reprodutivas ou outros tecidos num estágio avançado de diferenciação, há em geral, a necessidade de se induzir uma volta ao estado meristemático para, em seguida, iniciar o processo de multiplicação. A desdiferenciação e a indução de regeneração de plantas a partir de calos é, muitas vezes, um processo difícil de ser obtida e pode demandar algum tempo de experimentação, até se obterem protocolos para multiplicação, além de ocasionar o aparecimento de mutantes indesejados, como variantes

somaclonais (LEE e PHILLIPS, 1988). Plantas produzidas por brotos formados diretamente tem alta chance de ser fenotipicamente normais, este método é utilizado para micropropagação de certas plantas, principalmente ornamentais (GEORGE, 1993). Todavia, a variação não está limitada a calos regenerantes (SKIRVIN et al., 1994). EVANS (1988) relatou consideráveis variações para características morfológicas (forma da flor, folha, altura de plantas), viabilidade do pólen e número de cromossomos entre plantas adventícias de *Nicotiana glauca* regeneradas diretamente de explantes foliares sem o calo intermediário. Plantas triplóides de *Passiflora foetida* regeneradas a partir de endosperma não exibiram nenhuma diferença óbvia na morfologia dos brotos quando comparados a plantas diplóides originadas de sementes. Embora ocorreu florescimento, nenhum fruto foi observado.

Uma técnica que tem sido bastante empregada na regeneração de plantas é o cultivo de protoplastos. D'UTRA VAZ et al. (1993) foram os primeiros a demonstrar a regeneração do maracujá amarelo por meio desta técnica, sendo posteriormente aplicada para várias espécies: *P. coccinea* Abul (OTONI et al., 1995a), *P. incarnata* (OTONI et al., 1995b), *P. amethystina*; *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. (DORNELAS e VIEIRA, 1993). A capacidade de regenerar plantas a partir de protoplastos permite a utilização de técnicas como hibridação somática e transformação genética de plantas (D'UTRA VAZ et al., 1993).

Um dos problemas do cultivo de protoplastos, encontrado por DORNELAS e VIEIRA (1993) foi a regeneração de plantas poliplóides, das quais cerca de 40% dos brotos produzidos eram tetraplóides, provavelmente pela presença da fase de calos ou devido a certos componentes do meio. Estes autores sugerem que novos ensaios sejam feitos para obter ou selecionar brotos adventícios de *Passiflora* citogeneticamente normais e estáveis a partir de

protoplastos. OTONI et al. (1995c) produziram híbridos somáticos tetraplóides pela fusão de protoplastos de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. incarnata* L.

Outras técnicas que tem sido utilizadas no cultivo *in vitro* de maracujazeiro são: cultura de meristemas e microenxertia (BIRICOLTI e CHIARI, 1994); florescimento *in vitro* (SCORZA e JANICK, 1980); regeneração de híbridos triplóides (MOHAMED et al., 1996); microestaquia (FREITAS, 1997); cultura de anteras visando produção de plantas haplóides (TSAY et al., 1984) e transformação genética. MANDERS et al. (1994) demonstraram a capacidade de transformar geneticamente esta importante frutífera tropical. Esta capacidade foi atribuída ao sistema de regeneração de *P. edulis* f. *flavicarpa* e ao fato dos explantes serem suscetíveis à infecção por uma estirpe desarmada de *Agrobacterium tumefaciens*.

Desde que se iniciou a cultura de tecidos em espécies de *Passiflora*, vários meios, combinações hormonais, variações nos teores de sais, vitaminas, outros compostos e condições de cultivo tem sido propostos com o objetivo de otimizar as técnicas de regeneração para vários tipos de explantes (MORAN ROBLES, 1978; SCORZA e JANICK, 1980; BARTOLO e MACEY, 1989; DREW, 1991; D'UTRA VAZ et al., 1993; BIRICOLTI e CHIARI, 1994; DORNELAS e VIEIRA, 1994; KAWATA et al., 1995; OTONI et al., 1995ab; FARIA e SEGURA, 1997ab).

A otimização das técnicas de regeneração *in vitro* permitirá a obtenção de clones selecionados de maracujá amarelo em grande escala, abrindo perspectivas para ensaios eficientes de transformação genética visando a introdução de genes responsáveis por características agronômicas desejáveis, superando as barreiras de incompatibilidade genética que são características dessa espécie.

2.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES *IN VITRO* DE MARACUJAZEIRO

Apesar da importância da cultura do maracujazeiro no Brasil, poucos estudos tem sido realizados a respeito de germinação de sementes desta cultura. As regras para análise de sementes (RAS) recomendam para *Passiflora edulis* Sims o uso de temperaturas alternadas 20 - 30° C, papel toalha como substrato, remoção do arilo e que o teste seja realizado no escuro, (BRASIL, 1992). PEREIRA e ANDRADE (1994) estudando condições ideais de germinação para maracujá doce obtiveram resultados de acordo com a RAS no que diz respeito a temperatura, porém não observaram diferenças significativas entre papel toalha e vermiculita.

A germinação de sementes in vitro possibilita a obtenção de explantes que apresentam excelente estado fitossanitário e fisiológico sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica (HU e WANG, 1983).

A germinação de sementes de maracujá in vitro fornece porta-enxertos para trabalhos de microenxertia (BIRICOLTI e CHIARI, 1994) e explantes para isolamento de protoplastos (DORNELAS e VIEIRA, 1993) e para cultura de tecidos (KANTHARAJAH e DOOD, 1990), que necessitam de materiais jovens e livres de contaminações como explantes.

Em trabalhos de cultura de tecidos (DORNELAS e VIEIRA, 1994), transformação genética (MANDERS et al., 1994; SILVA, 1998) e cultivo de protoplastos (D'UTRA VAZ et al., 1993; OTONI et al., 1995a) de várias espécies de maracujá, as sementes foram germinadas em solo e composto orgânico em casa de vegetação. Porém, nestes casos os tecidos vegetais necessitavam passar por um processo de desinfestação antes de serem cultivados *in vitro*. Este processo pode afetar os tecidos das plantas. A permanência de resíduos de cloro pode ser

prejudicial aos tecidos e comprometer seu desenvolvimento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Em testes *in vitro* BIRICOLTI e CHIARI (1994) verificaram que nenhuma semente não escarificada germinou e que as sementes escarificadas germinaram após uma semana, embora muitas pararam seu crescimento após a emergência da radícula. Outro fato observado foi que o desenvolvimento das plântulas foi grandemente reduzido pela desinfestação das sementes (com 1% de hipoclorito por 15 minutos e enxaguadas em água destilada por 5 vezes); enquanto que sementes desinfestadas não germinaram, em sementes não tratadas a germinação foi de 86,4%.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE TECIDOS COM MATERIAL ADULTO DE MARACUJAZEIRO AMARELO

3.1.1 Ensaios de regeneração de brotos

3.1.1.1 Material Vegetal

Para estes estudos foram testados os acessos: '156 x 123', '309', '352', ('156 x 123') x ('118 x 204') e '156 x 180', desenvolvidos e cedidos pelo IAPAR - Londrina - PR. Plantas com 6 meses de idade foram mantidas em casa de vegetação (Figura 2 A).

TABELA 1. PROCEDÊNCIA DOS ACESSOS DE MARACUJÁ - AMARELO TESTADOS NOS ENSAIOS DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS ADULTAS.

ACESSOS	PROCEDÊNCIA
352	Ângulo - PR
156 x 180	Pacaembú - SP x Botucatu - SP
156 x 123	Pacaembú - SP x Araguari - MG
309	Ibaiti - PR
(156 x 123) x (118 x 204)	(Pacaembú - SP x Araguari - MG) x (Marília - SP x Penápolis - SP)

3.1.1.2 Preparo dos explantes

Os explantes utilizados foram segmentos obtidos de folhas jovens de plantas com seis meses de idade mantidas em casa de vegetação, das quais foram removidas as bordas e a nervura central; os explantes ficaram com 1cm^2 .

3.1.1.3 Desinfestação

A desinfestação da superfície foliar foi obtida pela imersão dos explantes em etanol 70% (v/v) por 40 segundos seguida de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2% (v/v) contendo 0,1% de Tween 20 durante 15 min, seguido de 4 banhos em água esterilizada conforme DORNELAS e VIEIRA (1994).

3.1.1.4 Meios de cultura

O meio de cultura básico utilizado foi o MS, acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose e 6 g.L^{-1} de ágar, preparado por dissolução dos componentes em água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1N antes da adição do ágar. O meio foi autoclavado por 20 min. a 120°C e

distribuído em placas de Petri esterilizadas, sendo 20 ml por placa. Todos os tratamentos permaneceram uma semana no escuro; posteriormente foram transferidos para ambiente com luz de $31,25 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. As culturas foram mantidas a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

No primeiro ensaio foram testadas diversas concentrações de BAP: 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0; 2,5 e $3,0 \text{mg.L}^{-1}$. Para esse experimento selecionou-se o acesso '156 x 180', o qual forneceu melhores resultados em ensaios prévios. O ensaio foi constituído por 6 placas de petri com 5 explantes em cada uma, para cada concentração testada.

No segundo ensaio foram utilizados todos os acessos citados no item "Material Vegetal", com exceção da '156 x 180' (testado anteriormente). O meio de cultura foi suplementado com 2mg.L^{-1} de BAP. O ensaio foi constituído de 24 vidros de cultura, sendo 6 com 5 explantes em cada placa, para cada acesso testado.

3.1. 2 Ensaio de microestaquia

Este ensaio teve por objetivo estabelecer uma população de microestacas in vitro. Foram utilizados segmentos caulinares de aproximadamente 1cm de comprimento, contendo no mínimo duas gemas axilares, sendo que estes foram obtidos de ramos jovens de plantas mantidas em casa de vegetação (desinfestação idem ao anterior).

3.1.2.1 Meios de cultura e tratamento hormonal

O meio de cultura utilizado foi o MS com metade da concentração de sais e vitaminas (MS/2). O ensaio foi constituído de dois tratamentos, um isento de reguladores e outro suplementado com as auxinas AIB (3 mg.L^{-1}) e ANA ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$).

Foram utilizados 10 tubos de ensaio para cada acesso, sendo 5 para cada tratamento, com 1 microestaca por tubo. Os acessos analisados foram os citadas no item "Material Vegetal".

3.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE MARACUJAZEIRO AMARELO

As sementes utilizadas neste ensaio foram fornecidas pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) Londrina. As sementes foram submetidas a desinfestação por imersão em etanol 70% por 40 segundos, e em seguida hipoclorito de sódio 1% com 0,1% de tween 20 por 15 minutos e enxaguadas em água destilada e autoclavada 4 vezes em câmara de fluxo laminar. Foram testados algodão, MS/2 líquido, MS/2 sólido como substrato; temperaturas constante de 23°C e alternada $23-30^{\circ} \text{C}$ (16/8 h) e a pré-embebição das sementes por 48 horas em água. As todos os tratamentos foram mantidos no escuro e submetidas aos tratamentos a seguir:

1. Água e algodão a 23°C ;

2. Meio de cultura MS/2 líquido em algodão a 23⁰ C;
3. Meio de cultura MS/2 sólido a 23⁰ C;
4. Sementes pré-embebidas por 48 h em água e em seguida água e algodão com alternância de temperatura 23-30⁰ C, por dez dias;
5. Sementes pré-embebidas por 48 h em água e em seguida meio MS/2 líquido em algodão com alternância de temperatura 23-30⁰ C, por dez dias;
6. Sementes pré-embebidas por 48 h em água e em seguida meio MS/2 sólido com alternância de temperatura 23-30⁰ C, por dez dias;
7. Sementes pré-embebidas por 48 h em água e em seguida água e algodão a 23⁰ C;
8. Sementes pré- embebidas por 48 h em água e em seguida meio MS/2 líquido em algodão a 23⁰ C;
9. Sementes pré-embebidas por 48 h em água e em seguida meio MS/2 sólido a 23⁰ C;

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, com 3 repetições. Cada parcela foi constituída de uma caixa Magenta[®] contendo 15 sementes. O tratamento de pré-embebição foi realizado por imersão das sementes em água destilada por 48 horas a 30⁰ C (constante). O meio MS, utilizado em alguns tratamentos foi constituído da metade da concentração dos sais e vitaminas, 1,5 % de sacarose e 6 g.L⁻¹ de ágar para os meios sólidos.

As caixas Magenta[®] contendo os substratos foram autoclavadas por 20 minutos a 1 atm. A transferência das sementes para as caixas ocorreu em câmara de fluxo laminar.

A avaliação foi realizada aos 18 dias após a instalação do teste. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. Os dados foram

15
analisados por meio do programa ESTAT (UNESP, Jaboticabal-SP). Os dados em
porcentagem foram previamente transformados para $\arcsin \sqrt{vx/100}$.

3.3 CULTURA DE TECIDOS UTILIZANDO MATERIAIS JUVENIS DE MARACUJAZEIRO AMARELO

3.3.1 Ensaios de regeneração de brotos

3.3.1.1 Material Vegetal

O material vegetal testado nestes experimentos foi obtido a partir de sementes
germinadas *in vitro*.

3.3.1.2 Preparo dos Explantes

As folhas cotiledonares não expandidas foram retiradas das magentas e manipuladas
sobre uma placa de petri esterilizada. Cada folha foi cortada em seis partes (0,3 a 0,5 cm). Os

explantes foram colocados com a face adaxial em contato com o meio de cultura. As placas foram seladas com filme plástico de polietileno.

3.3.1.3 Meios de Cultura

Quatro meios com diferentes concentrações de fitorreguladores e vitaminas foram testados para regeneração. O meio de cultura básico continha os sais MS, 30g.L⁻¹ de sacarose, e a citocinina BAP. Dois tratamentos testaram o complexo vitamínico MS com 1 e 2 mg.L⁻¹ BAP, e em outros dois, o complexo vitamínico B₅ (GAMBORG et al., 1968) (Tabela 2) com 1 e 2 mg.L⁻¹ BAP, solidificados com 2,6 g.L⁻¹ Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA). Os meios foram preparados por dissolução dos componentes em água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1N antes da adição do agente solidificante. O meio foi autoclavado por 20 min. a 120°C e distribuído em placas de Petri esterilizadas, sendo 20 ml por placa.

As culturas foram mantidas à temperatura de 25±2°C no escuro durante uma semana, sendo posteriormente transferidas para luz de 9,75 μmol. m⁻². s⁻¹ e fotoperíodo de 16h. Os explantes foram repicados a cada 15 dias em alternância de meios suplementados e não suplementados com regulador de crescimento, durante dois meses.

Foram analisadas as porcentagens de explantes com gemas e o número médio de gemas por explante. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições. Cada parcela foi constituída de uma placa de petri contendo 6 explantes. As

médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, por meio do programa ESTAT (UNESP, Jaboticabal-SP).

TABELA 2 COMPOSIÇÃO DOS COMPLEXOS VITAMÍNICOS MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) E B5 (GAMBORG et al., 1968).

Vitaminas	Meio MS (mg.L ⁻¹)	Meio B ₅ (mg.L ⁻¹)
Tiamina. HCl	0,1	10,0
Ácido nicotínico	0,5	1,0
Piridoxina HCl	0,5	1,0
Glicina	2,0	-

3.3.1.4 Enraizamento

Após 2 meses de cultura os brotos regenerados foram repicados para os meios MS e MS com complexo vitamínico B5, com a concentração de sais, vitaminas e sacarose diluídas pela metade, para promover o enraizamento. Como os brotos não desenvolveram-se uniformemente foram isolados 20 brotos desenvolvidos em cada meio, sendo 5 brotos por magenta, para análise da porcentagem de enraizamento.

3.3.1.5 Aclimação

Plântulas enraizadas foram retiradas do meio de cultura, tiveram suas raízes lavadas e seus ápices radiculares removidos, para testes de citogenética; em seguida foram transplantadas para potes plásticos, contendo substrato esterilizado por autoclavagem (1 atm por 20 min) na proporção de 1:1 solo e vermiculita.

Os potes com substrato contendo as plântulas permaneceram em uma mini-estufa coberta com plástico polietileno, saturada com água, pelo menos uma vez ao dia para manter a umidade. Após 15 dias o plástico foi removido e as plântulas permaneceram por mais uma semanas nas condições de laboratório sendo em seguida transferidas para casa de vegetação.

3.3.1.6 Citologia

Ápices radiculares em ativo crescimento foram excisados das plântulas regeneradas no momento do transplante para fase de aclimação e um mês após transplante para substrato, foram pré-tratados com 0,03% de 8 - hidroxiquinolina (C_6H_7NO) por 4 horas e fixados em 1:3 ácido acético e álcool etílico, por 24 horas, transferidos para álcool 70 % e conservados em geladeira.

A coloração foi realizada através do método de Feulgen. O material foi retirado da geladeira com antecedência, as raízes foram lavadas em água destilada por 5 minutos duas

vezes. A hidrólise ocorreu em HCl 1N a 60⁰ C por 8 minutos, as raízes foram lavadas em água destilada por 5 minutos duas vezes.

As raízes permaneceram em reativo de Schiff em frascos escuros durante 45 minutos e em seguida lavadas em água corrente durante 5 minutos.

Preparação das lâminas: as raízes foram colocadas em placas de petri contendo ácido acético a 45% por 5 minutos; após serem esmagadas com barrinha de vidro, removeram-se os fragmentos, as laminulas foram colocadas e as lâminas aquecidas em chama e esmagadas. As lâminas foram observadas em microscópio ótico. Foram analisadas 12 plântulas regeneradas.

Âpices radiculares de plântulas originadas de sementes foram usados como controle.

3.3.2 ENSAIOS DE MICROESTAQUIA

3.3.2.1 Preparo das microestacas

Sementes germinadas in vitro foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio MS para o desenvolvimento das plântulas. Quando estas atingiram 7 cm de altura (2 meses), as folhas foram eliminadas e o caule dividido em segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, formando microestacas, cada uma contendo no mínimo duas gemas axilares, as quais foram repicadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio (Figura 4 A).

3.3.2.2 Meios de Cultura

Os meios básicos foram compostos pelos sais MS, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose e solidificados com 2,6 g.L⁻¹ de Phytigel®. O ensaio foi constituído por 20 tubos de ensaio, sendo que 10 contendo complexo vitamínico MS e 10 contendo complexo vitamínico B₅. As microestacas foram incubadas nas mesmas condições descritas acima. Foram avaliados o número de folhas expandidas e o número de raízes formadas. As folhas produzidas foram utilizadas em outros ensaios de regeneração.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade por meio do programa ESTAT (UNESP, Jaboticabal-SP).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CULTURA DE TECIDOS COM MATERIAL ADULTO DE MARACUJAZEIRO AMARELO

4.1.1 Ensaio de Regeneração de Brotos

A resposta morfogênica dos explantes do acesso '156 x 180', ocorreu em meio MS suplementado com BAP, nas extremidades dos mesmos, após 7 dias de cultivo, sendo observada a formação de calos. Resultados similares foram obtidos por BIASI et al. (2000), em seus experimentos utilizando segmentos internodais de maracujá amarelo, onde houve formação de calos. VESTRI et al. (1990) também observaram a formação de calos em explantes de *Passiflora coerulea* cultivados *in vitro*.

Neste trabalho verificou-se o início de formação de gemas nos meios suplementados com BAP nas concentrações de 1,0; 1,25; 1,5 e 2mg.L⁻¹; os melhores resultados foram obtidos na concentração de 2mg.L⁻¹ (40 % dos explantes com gemas). Concentrações abaixo de 1mg.L⁻¹ e acima de 2mg.L⁻¹ mostraram-se ineficientes, podendo o excesso de fitorreguladores ser tóxico para os explantes. Estes dados estão de acordo com os obtidos por DORNELAS e VIEIRA (1994) e BIASI et al.(2000).

Avaliando-se a resposta morfogênica dos explantes dos demais acessos no meio suplementado com 2mg.L⁻¹ de BAP, após 21 dias de cultura, observou-se a organogênese,

com as seguintes porcentagens de explantes com gemas: '156 x 123' - 64%; '(156 x 123)' x '(118 x 204)' - 28%; '352' - 30%; '309' - 0%. Em todos os casos as gemas formadas não alongaram, amarelaram e morreram em seguida. O índice de contaminação do ensaio foi de 10%, sendo observado apenas para o acesso '352'. O crescimento in vitro de tecidos adultos de espécies *Passiflora* é difícil de ser obtido (DREW 1991), apesar de brotos já terem sido produzidos a partir de segmentos foliares de *P. edulis* Sims de plantas de três anos, utilizando meio MS suplementado com 3 % de sacarose, 1 μ M de BA (0,225mg.L⁻¹) e 1 μ M de AIB (0,204 mg.L⁻¹) durante 1 mês (KAWATA et al.,1995).

Não há muitos relatos na literatura sobre regeneração de espécies de *Passiflora* partindo de material adulto. São necessários novos estudos para estabelecer protocolos eficientes de regeneração com estes tipos de explante.

4.1.2 Ensaio de Microestaquia

A análise dos ensaios de microestaquia demonstrou que o meio MS/2 com metade da concentração de vitaminas, sem adição de fitorreguladores, foi ineficiente para promover o desenvolvimento e enraizamento das microestacas (Figura 2 C).

Resultados favoráveis para o enraizamento foram obtidos em meio MS com metade da concentração de sais e de vitaminas, suplementado com AIB (3 mg.L⁻¹) e ANA (0,5 mg.L⁻¹), onde a formação de raízes ocorreu em todos os acessos analisados na seguinte proporção: '352' - 60%; '309' - 40%; '(156 x 123)' x '(118 x 204)' - 40%; e '156 x 180' -20%; '156 x 123' -

20% (Figura. 2 D). Estas auxinas foram utilizadas por MANDERS et al. (1994) para o enraizamento de plantas transformadas geneticamente e para plantas regeneradas a partir de protoplastos (D'UTRA VAZ et al., 1993). Apesar da formação de raízes nestas estacas, a parte aérea não desenvolveu, as folhas tornaram-se cloróticas e caíram. DREW (1991) relatou que altas doses da citocinina 2-iP (30 mg.L^{-1}) e sulfato de adenina (80 mg.L^{-1}) foram requeridas para o alongamento de gemas de segmentos nodais, e que estes devem ser colocados na posição horizontal em contato com o meio de cultura, sendo que o maior crescimento ocorreu com gemas posicionadas entre o 6^o e 8^o nó a partir do ápice. Porém, altas doses de citocininas, especialmente BA, induzem a vitrificação dos explantes (BIRICOLTI e CHIARI, 1994).

Embora não se conheça ainda de forma satisfatória, porque certos eventos regenerativos *in vitro* são mais facilmente induzidos em alguns tecidos do que em outros, admite-se que estas diferentes expressões morfogenéticas se reflitam, de alguma maneira, na natureza e no grau de diferenciação destes tecidos, outra mudança envolve o estabelecimento de alterações no metabolismo especializado, entendido como padrão de desenvolvimento característico da célula madura (KERBAUY, 1998).

Em função dos dados obtidos não serem satisfatórios, novos experimentos foram propostos utilizando materiais juvenis como fonte de explante, partindo de sementes germinadas *in vitro*.

4.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE MARACUJAZEIRO AMARELO

A análise da variância da porcentagem de germinação de sementes de maracujá amarelo é apresentada no ANEXO 1.

Pode-se observar na Figura 1 que as sementes pré-embebidas por 48 horas colocadas para germinar em algodão e água e em alternância de temperatura (23-30⁰ C) apresentaram resultados superiores em relação aos demais tratamentos. A germinação nos substratos algodão + MS/2 líquido e MS/2 sólido à 23⁰ C com e sem pré-embebição foram iguais entre si e inferiores aos tratamento de pré-embebição e temperaturas alternadas em algodão.

As *Passifloras* são incluídas por BALLARD (citado por MORLEY-BUNKER, 1980) na família de plantas cujas sementes apresentam dormência devido aos mecanismos de controle de água para o interior das sementes. A pré-embebição pode auxiliar na lixiviação de eventuais inibidores presentes no tegumento das sementes (HARTMAN et al., 1990) e é o tratamento mais eficiente na superação da dormência e na expressão do vigor em sementes de abacaxizeiro (LUZ et al., 1989).

A temperatura também tem grande influência no processo germinativo, não só em relação à velocidade do mesmo mas também na porcentagem de germinação das sementes (CARVALHO e NAKAGAWA, 1983). A flutuação da temperatura pode produzir pequenas rachaduras provocadas pela expansão e retração do tegumento facilitando assim a passagem de água para o interior da semente (BEWLEY e BLACK, 1982). Para *Passiflora giberti*, a maior porcentagem de sementes germinadas que originaram plântulas normais foi também obtida em condições de temperatura alternada (30 / 20⁰ C) (DUARTE FILHO et al., 1998). Outras

espécies também requerem alternância periódica de temperatura, como no caso do urucum (20 -35⁰ C) (GOMES e BRUNO, 1992). Ao contrário do verificado por BIRICOLTI e CHIARI (1994) onde a desinfestação foi prejudicial à germinação, nossos resultados demonstraram que a desinfestação não afetou o processo de germinação, e que a escarificação não foi necessária.

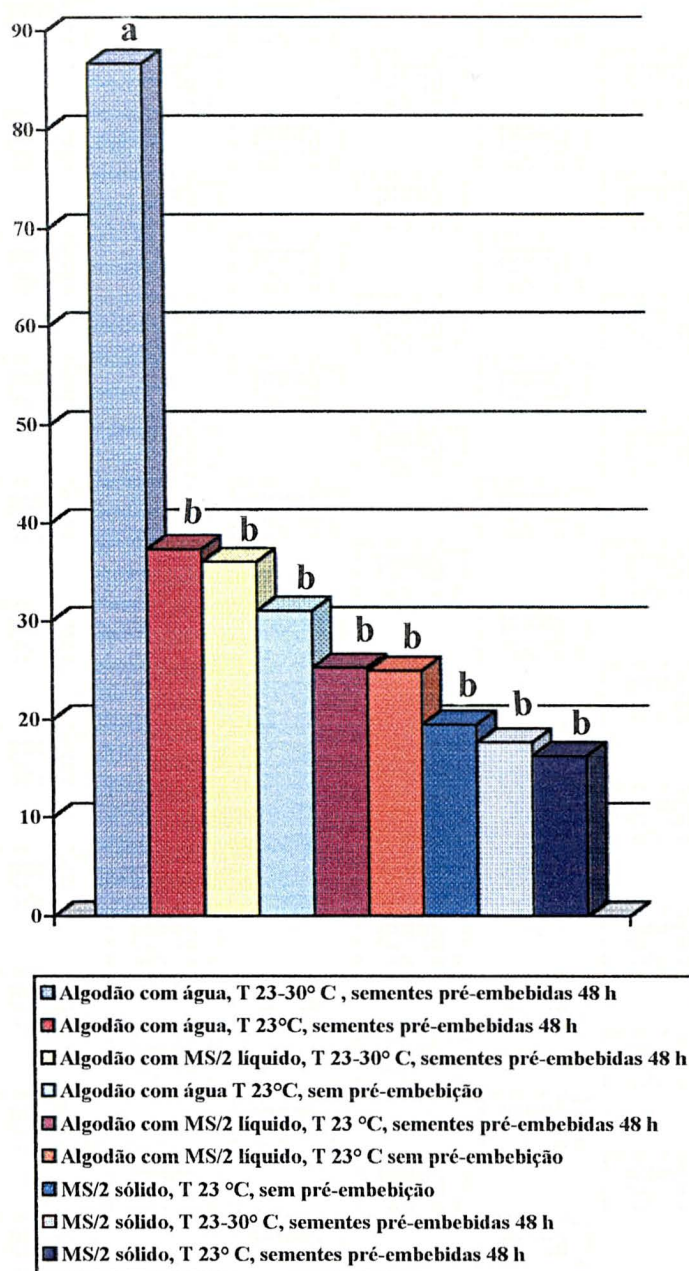


FIGURA 1. PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE MARACUJAZEIRO AMARELO SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS, APÓS 18 DIAS. MÉDIAS SEGUIDAS PELA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE TUKEY A 5 % DE PROBABILIDADE.

4.3 CULTURA DE TECIDOS DE JUVENIS DE MARACUJAZEIRO AMARELO

4.3.1 Regeneração de Brotos

Neste experimento folhas cotiledonares foram usadas como explante. Segundo MARGARA (1988), o primeiro par de folhas de uma planta é capaz de regenerar mais rapidamente que as folhas subseqüentes. Explantes de plântulas apresentam algumas vantagens do ponto de vista experimental na determinação de um protocolo de de propagação quando comparado ao tecido adulto. A disponibilidade de explantes sem contaminação e a pronta capacidade de crescimento e resposta à aplicação de fitorreguladores dos tecidos juvenis permitem a condução de inúmeros testes em meios nutritivos e condições ambientais da cultura. A variabilidade de genótipo e as diferenças fisiológicas entre tecidos isolados de tecido menos juvenil limitam contudo, a eficiência desta estratégia (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Nossos resultados estão de acordo com estes autores.

A indução de brotos ocorreu via organogênese direta. A resposta morfogenética pôde ser observada após 10 dias de cultivo. Aos 30 dias foi avaliado o número de explantes que formaram gemas (Tabela 3). A formação das gemas adventícias ocorreu principalmente nas bordas dos explantes, formando grupos, os quais foram divididos ao longo do cultivo até que brotos isolados pudessem ser obtidos. Houve diferenças significativas na porcentagem de explantes com gemas, tanto em relação aos complexos vitamínicos quanto às doses de BAP com aumento na concentração de 1 para 2 mg.L⁻¹ (Tabela 3). BIASI et al. (2000) observaram

em seus experimentos que a formação de gemas aumentou até a concentração de $2,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e que doses superiores foram tóxicas para os segmentos internodais. Estes resultados estão de acordo com os relatado por DORNELAS e VIEIRA (1994).

TABELA 3. EFEITO DO COMPLEXO VITAMÍNICO SOBRE A PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM GEMAS E O NÚMERO MÉDIO DE GEMAS DE MARACUJAZEIRO AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEG.) POR EXPLANTE, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM DIFERENTES MEIOS.

Sais	Vitaminas	Concentração de BAP (mg.L^{-1})	Número de explantes com gema (%)	Número médio de gemas por explante
MS	B ₅	2	78,4 a	8,38 a
MS	B ₅	1	71,7 b	6,51 b
MS	MS	2	51,7 c	5,40 bc
MS	MS	1	43,4 d	4,61 c

* Média de dez repetições

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferam significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os meios de cultura suplementados com o complexo vitamínico B₅ mostraram maior porcentagem de explantes com gemas em ambas as concentrações de BAP, sendo que o número médio de gemas por explante também foi superior aos demais na presença de 2 mg.L^{-1} de BAP (Tabela 3) (Figura 3). SILVA (1998) também utilizou o meio MS suplementado com o complexo vitamínico B₅ e 1 mg.L^{-1} de BAP para ensaios de transformação genética de maracujá amarelo. Meios suplementados com o complexo vitamínico MS mostraram resultados similares ao encontrado por DORNELAS e VIEIRA (1994), onde 41,7 % dos explantes foliares e 66,7 dos explantes cotiledonares produziram gemas no meio contendo sais e vitaminas MS e suplementado com 1 mg.L^{-1} de BAP.

No complexo vitamínico do meio B₅, a concentração de tiamina é 100 vezes maior e as de ácido nicotínico e piridoxina são 2 vezes maiores quando comparado ao complexo vitamínico do meio MS (Tabela 2). Apesar do fato das vitaminas serem freqüentemente utilizadas de acordo com a formulação de MURASHIGE e SKOOG (1962), o trabalho posterior de LINSMAIER e SKOOG (1965) mostrou que apenas a tiamina tinha efeito estimulador, ou melhor era essencial para o crescimento de calos de fumo. Estes autores sugeriram um aumento na concentração de tiamina para 0,4 mg.L⁻¹ e a eliminação da piridoxina e ácido nicotínico, pois estes eram ligeiramente inibitórios ao crescimento. A glicina era dispensável. A tiamina é essencial para a maioria dos meios porque ela funciona como uma co-enzima que auxilia os ácidos orgânicos no ciclo da respiração (KYTE e KLEYN, 1999). O conteúdo de tiamina do meio MS pode não ser suficiente para obter ótimos resultados em algumas culturas. Quando a concentração de tiamina do meio foi aumentada de 0,1 para 1,67 mg.L⁻¹, a freqüência com que embriões zigóticos de soja formaram embriões somáticos aumentou de 33 para 58 % (BARWALE et al., 1986, citado por GEORGE, 1993).

Além disso segundo OHIRA et al. (1976), em culturas de células, as plantas podem ser divididas em 2 grupos de acordo com seu requerimento em tiamina. O grupo que inclui soja, fumo e arroz requer tiamina, enquanto outro, incluindo *Ruta* e amendoim, pode crescer em meios com ausência dessa vitamina. GAMBORG et al. (1968) compararam o complexo vitamínico B₅ e o uso de tiamina sozinha no cultivo de células de soja e verificaram que somente a tiamina era necessária para o crescimento das células. Parece haver um estreito relacionamento entre o grau de desdiferenciação das células cultivadas e o seu requerimento em tiamina: quanto mais alto o grau, maior o requerimento. Nossos dados sugerem que para o maracujazeiro, o aumento na concentração de vitaminas no meio de cultura, intensifica a

formação de brotos adventícios, e que a ausência de glicina não afeta a regeneração.

GAMBORG (1970) observou que a adição de aminoácidos não é necessária e que eles podem inibir o crescimento *in vitro*.

GEORGE (1993) sugere que há uma interação entre tiamina e reguladores de crescimento da classe das citocininas. DIGBY e SKOOG (1966) verificaram que calos de fumo cultivados em um meio com alta concentração de cinetina (1mg.L^{-1}) para seu desenvolvimento normal, produziam um nível adequado de tiamina para suportar seu crescimento; quando o tecido foi movido para meio sem citocinina houve paralisação do crescimento, exceto quando tiamina foi fornecida. Altas concentrações de cinetina ativam a biosíntese dessa vitamina pelos tecidos. Outras duas citocininas foram testadas, 2-iP e BAP, e foram ativas da mesma maneira que a cinetina.

2.1.1 Alongamento e Enraizamento

Após 2 meses de cultivo em sistema de alternância (a cada 15 dias), em meios com e sem regulador de crescimento. Os brotos permaneceram por mais 30 dias em meios sem reguladores de crescimento para permitir o alongamento. DORNELAS e VIEIRA (1994) observaram que o meio suplementado com BA foi desvantajoso para o alongamento dos brotos. Devido as citocininas possuírem efeito residual, faz-se necessária uma fase intermediária de alongamento com o objetivo de desintoxicar as culturas antes do enraizamento (RUGINI e VERMA, 1982). Após 15 dias de cultivo nos meios diluídos iniciou-

se a formação de raízes (Figura 3 B). O enraizamento foi de 80% para o meio MS/2 e 93% para o meio MSB5/2. O enraizamento nas espécies herbáceas geralmente é fácil e diluições das formulações básicas utilizadas para a multiplicação, tem na maioria das vezes, possibilitado melhor enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O cultivo em sistema de alternância entre meios suplementados e não suplementados com fitorreguladores parece ter sido decisivo para o enraizamento *in vitro*. A adição de auxina não foi necessária para promover o enraizamento das plântulas regeneradas, como anteriormente observado para espécies de *Passiflora* (MORAN ROBLES, 1978; DORNELAS e VIEIRA, 1994; FREITAS, 1997; FARIA e SEGURA, 1997a; BIASI et al., 2000). Segundo KAWATA et al. (1995) a presença de auxinas no meio de regeneração (AIB, ANA e 2,4 D) não promove enraizamento nem o desenvolvimento de brotos, em vez de formar raízes, as auxinas produzem calos na base dos brotos transplantados e, quando formaram raízes, essas são anormais. Embora outros autores relataram o efeito benéfico das auxinas para enraizamento de espécies de *Passiflora*, 1 mg.L⁻¹ de ANA foi utilizado para *P. edulis* (KANTHARAJAH & DODD, 1990), para culturas derivadas de cotilédones (DORNELAS & VIEIRA, 1994) e para endosperma maduro (MOHAMED et al., 1996), 0,88 mg.L⁻¹ de AIA para gemas axilares (DREW, 1991). Combinações de auxinas com 3 mg.L⁻¹ de AIB e 0,5 mg.L⁻¹ de ANA também foram utilizadas para enraizamento de plantas regeneradas por protoplastos (D'UTRA VAZ et al., 1993) e plantas transformadas (MANDERS et al., 1994).

2.1.2 Transplante e Aclimação

Esta fase envolve a mudança de condições heterotróficas para autotróficas e a aclimação da planta nas condições de casa de vegetação (HARTMAN et al., 1990).

As plântulas cultivadas em qualquer meio e as microestacas, mostraram taxa de sobrevivência em torno de 100% (Figuras 3 e 4 C). Neste trabalho não houve necessidade de podar as raízes e nem eliminação de todas as folhas para garantir altas taxas de sobrevivência na aclimação de plantas de maracujazeiro regeneradas *in vitro*, como sugerido por FARIA e SEGURA (1997b) os quais observaram taxas de sobrevivência (95-100%) utilizando este procedimento. DORNELAS e VIEIRA (1994) verificaram que a presença de folíolos foi essencial para uma bem sucedida aclimação (60 %). Plântulas de maracujá sem raízes visíveis, transferidas para fase de aclimação *in vivo* tiveram um bom desenvolvimento, sugerindo que não é essencial a formação de raízes para garantir a sobrevivência e o desenvolvimento das plântulas (FREITAS, 1997). Em todos os casos a manutenção da alta umidade foi essencial.

2.1.3 Citologia

O número de cromossomos é determinado pela contagem dos cromossomos na célula em metáfase. Plantas produzidas por regeneração direta de brotos tem alta chance de ser fenotipicamente normais (GEORGE, 1993).

Não foi possível determinar o número de cromossomos quando ápices radiculares foram coletados diretamente do meio de cultura no momento do transplante. A contagem só foi possível após 30 dias do estabelecimento das plântulas em substrato. Algumas vezes as raízes formadas *in vitro* não são funcionais, havendo necessidade de substituição por novas *in vivo* (HARTMAN et al., 1990). Raízes formadas *in vitro* eram relativamente mais espessas, que aquelas formadas após transplante para substrato.

A maioria das células analisadas encontravam-se em prófase condensada, onde o número de cromossomos não pôde ser determinado. Quando o tempo de ação da 8-hidroxiquinolina foi aumentado para 5 horas, células em metáfase foram visualizadas e o número de cromossomos determinado.

Todas as plântulas regeneradas exibiram o número diplóide normal de cromossomos típicos da espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. ($2n = 18$). DORNELAS e VIEIRA (1994) pré-trataram ápices radiculares com hidroxiquinolina por apenas 2:45 horas, enquanto que para MOHAMED et al. (1996) 4 horas foram suficientes. Em nossos ensaios, 5 horas de pré-tratamento em hidroxiquinolina foram necessárias.

Outros exemplos onde plantas regeneradas foram geneticamente estáveis: *Allium tuberosum*, por proliferação de gemas axilares (PANDEY et al., 1992) *Cucumis melo*,

produzidos por brotos primários (EZURA et al., 1997) e *Asparagus cooperi* por organogênese indireta (GHOSH e SEN, 1992). Embora plantas de melão (EZURA et al., 1992) e tabaco (EVANS, 1988) regeneradas diretamente a partir de tecidos da semente e foliares (respectivamente) apresentaram variações no número de cromossomos.

4.2.2 Ensaios de Microestaquia

Em relação às microestacas, não houve necessidade da adição de citocininas para o alongamento da parte aérea. Resultados similares foram observados por FARIA e SEGURA (1997b). A taxa de enraizamento foi de 75 % e ocorreu em meio contendo sais e vitaminas MS, sem adição de auxinas (Figura 4 B). A redução da concentração salina e das vitaminas para enraizamento não foi essencial como sugerido por FREITAS (1997), porém a diluição pode aumentar o número de microestacas enraizadas. O número de folhas expandidas e o número de raízes foram estatisticamente iguais (Tabela 4).

Como relatado por vários autores, o cultivo *in vitro* a partir de tecidos juvenis é facilmente induzido.

TABELA 4 NÚMERO DE FOLHAS E RAÍZES PRODUZIDAS PELAS MICROESTACAS DO MARACUJAZEIRO AMARELO (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEG.), APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

Sais	Vitaminas	Número de folhas	Número de raízes
MS	B ₅	5,8 a *	2,8 a
MS	MS	5,0 a	2,0 a

* Médias de dez repetições

Médias seguidas pelas mesmas letras em cada coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

5 CONCLUSÕES

- 1) O melhor tratamento para germinação *in vitro* de sementes de maracujá amarelo é a pré-embrição das sementes por 48 horas em água destilada, utilizando algodão como substrato e mantendo as sementes em um regime de alternância de temperatura (23 - 30 °C) por dez dias. Estes resultados favorecem os trabalhos de cultura de tecidos desta espécie, onde a uniformidade de germinação é um fator essencial, além de eliminar o efeito negativo da desinfestação sobre o material vegetal.
- 2) Meios suplementados com complexo vitamínico B₅, demonstraram aumento na capacidade regenerativa de explantes foliares de maracujazeiro amarelo, acima de 70% em ambas as doses de BAP, quando comparados ao complexo vitamínico MS;
- 3) A glicina não é necessária para organogênese dessa cultura;
- 4) O cultivo em sistema de alternância de meios suplementados e não suplementados com fitorreguladores parece influir positivamente no enraizamento dos brotos regenerados;
- 5) Plantas regeneradas por organogênese direta, apresentaram número normal de cromossomos (2n=18);
- 6) Novos experimentos são necessários para a regeneração e microestaquia *in vitro* com material adulto de maracujá amarelo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTOLO, W. C. F.; MACEY, M. J. K. Cobalt requirement i tissue culture of three species: *Brassica oleracea* L., *Passiflora mollissima* Bailey, and *Saintpaulia ionantha* Wendl. **The Journal of Horticultural Science**. p.643-647, 1989.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. **Physiology and Biochemistry of seeds**. Springer - Verlag, Berlin, 1982, p. 77-101, il.
- BIASI, L.A.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f.*flavicarpa*). **Scientia Agricola**. 2000. In press, 1997.
- BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *edulis*. **Advanced in Horticultural Science**, Firenze, v. 8, p.171-175, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Brasil. **Regras para análise de sementes**. Brasília, Coordenação de Laboratório Vegetal. Departamento Nacional de Defesa Vegetal, 1992, 365 p.
- CARVALHO, N.M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. 2 ed. Campinas, Fundação Cargill, 1983, 429 p.
- DIGBY, J; SKOOG, F. Cytokinin activation of thiamine biosynthesis in tobacco callus cultures. **Plant Physiology**, v. 41, p. 647-652, 1966.
- DORNELAS, M. C. ; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 103-106, 1993.
- DORNELAS, M. C. ; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.36, p. 211-217, 1994.
- DUARTE FILHO, J.; VASCONCELLOS, M.A.S.; CARVALHO, C. M. Germinação de sementes de *Passiflora giberti* N.E. Brow sob temperatura controlada. In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro, 5., 1998, Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal, p 315-316, 1998.
- D'UTRA VAZ, F. B.; SANTOS, A. V. P. dos; MANDERS, G.; COKING, E.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger): the importance of the antibiotic cefotaxime in culture medium. **Plant Cell Reports**, Berlin, 12: p. 220-225. 1993.

- DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, 23-27, 1991.
- EVANS, D. A. Applications of somaclonal variation. In: **Biotechnology in agriculture**. A. Mizrahi (ed.), New York, 1988, p. 203-233.
- EZURA, H; AMAGAI, H; YOSHIOKA, K; OOSAWA, K. Highly frequent appearance of tetraploidy in regenerated plants, a universal phenomenon, in tissue cultures of melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Science**, v. 85, p. 209-213, 1992.
- EZURA, H; KIKUTA, I; OOSAWA, K. Long-term ploidy stability of shoot primordium cultures and produced plants of melon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 48, 31-35, 1997.
- FARIA, J.L.C. & SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explantes of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v. 33 (3), p. 209-212, 1997a.
- FARIA, J.L.C. & SEGURA, J. Micropropagation of yellow passion fruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, v. 32 (7), p.1276-1277, 1997b.
- FERREIRA, M. E; CALDAS, L. S; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA - SPI/EMBRAPA CNPH, v.1, 1998. p. 21-43.
- FREITAS, I. M. N. Micropropagação *in vitro* de maracujazeiro. **Actas de Horticultura**. v.18, p.103-106, Vilamoura, Portugal, 1997.
- GAMBORG, O. L; MILLER, R. A, OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures os soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p.151-158, 1968.
- GAMBORG, O. L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiology**, v. 45, p. 372-375, 1970.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1 - The Technology, 2 ed. Wilts, England, 1993, 574 p.
- GHOSH, B; SEN, S. Stable regeneration in *Asparagus cooperi* Baker as controlled by different factors. **Plant Science**, v. 82, p. 119-124, 1992.
- GOMES, S. de S.; BRUNO, R. de L. A. Influência da temperatura e substrato na germinação de sementes de urucum (*Bixa Orellana* L.) **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, SP, v. 14, n. p.47, 1992.

- GRATTAPAGLIA, D., CALDAS, L.S., SILVA, J.R., MACHADO, M. A. Cultura de tecidos de maracujá. In: SÃO JOSÉ, A. R., FERREIRA, F. R., VAZ, R. L. (Coords.) **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 61-77.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA - SPI/EMBRAPA CNPH, v.1, 1998, p.183-260.
- HARTMAN, T. H; KESTER, D. E; DAVIS, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. Englewood Cliffs, New Jersey, 5 ed, p.647, 1990.
- HU, C.Y.; WANG, P. J. Meristem shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A. ; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y., ed. **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breedings**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.177-227.
- KANTHARAJAH, A .S., DODD, W. A. in vitro micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, v. 65, p.337-339, 1990.
- KAWATA, K.; USHIDA, C., KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of Passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **J. Plant Physiology**, v. 147, p.281-284, 1995.
- KERBAUY, G. B. **Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA - SPI/EMBRAPA CNPH, v.2, 1998, p.519-531.
- KOCH, R. C. **Propagação vegetativa de *Passiflora actinea* HOOKER por meio da micropropagação e da estaquia semilenhosa**. Dissertação de mestrado. UFPR. Curitiba, 1999.
- KYTE, L; KLEYN, J. **Plants from test tubes. An introduction to micropropagation**. 3 ed, Portland, Oregon, 1999.
- LEE, M; PHILLIPS, R. L. The chromosomal basis of somaclonal variation . **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.39, p.413-437, 1988.
- LINSMAIER, E. M; SKOOG, F. Thiamine requirement of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 18, p. 100-127, 1965.
- LUZ, S.M.B.P; MATOS, A. P.; CABRAL, J.R.S.C.; COSTA, J.A. Tratamento para acelerar e uniformizar a germinação de sementes de abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas Bahia, v. 21, n. 1, p. 65-69, 1999.

- MANDERS, G.; OTONI, W. C.; D'UTRA VAZ, F. B.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Transformation of passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, 13:697-702. 1994.
- MARGARA, J. **Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*: Los meristemas y la organogénesis**. Vs. Espanhola Box, j. & Terron, U. ed. Mundi-Prensa, 1988.
- MOHAMED, M. E.; HICKS, R. G. T.; BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 46:161-164, 1996.
- MORAN-ROBLES, M. J. Multiplication végétative, in vitro, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg. et de *P. molissima* Bailez. **Fruits**, v. 33, p.693-699, 1978.
- MORAN ROBLES, M. J. Potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et *P. mollissima* Bailey en culture *in vitro*. **Turrialba**. v. 29, n.3, p.224-228, 1979.
- MORLEY-BUNKER, M. J. S. Seed coat dormancy in *Passiflora* species. **Annual Journal**, Canterbury, V. 8, p. 72-84, 1980.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** v. 15, p.473-497, 1962.
- NAKAYAMA, F. Cultivo *in vitro* de tejidos de *Passiflora caerulea*. **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Plata**, v.42, p.63-74, 1966.
- OHIRA, K. IKEDA, M. OJIMA, K. Thiamine requirements of various plant cells in suspension culture. **Plant & Cell Physiology**, v.17, p. 583-590, 1976.
- OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: RUGGIERO, C (Ed). **A cultura do maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p.218-246.
- OTONI, W. C; CASALI, V. W. D; CECON, P. R; POWER, J. B. Regeneração de plantas de maracujazeiro (*Passiflora coccinea* Aubl.) a partir de protoplastos derivados de mesófilo. **Revista Ceres**. v. 42 (243), p. 461-468, 1995a.
- OTONI, W. C., CASALI, V. W. D; CECON, P. R; DAVEY, M. R. POWER, J.B. Influência do antibiótico cefotaxime na cultura de protoplastos derivados de mesófilo de *Passiflora incarnata* L. **Revista Ceres**, v.42, p.507-515, 1995b.
- OTONI, W. C., BLACCKHALL, N. W; d'UTRA VAZ; CASALI, POWER, J.B; V. W; DAVEY, M. R. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener. and *P. incarnata* L. **Journal of Experimental Botany**, v.46, p.777-785, 1995c.

- PANDEY, R.; CHANDEL, K.P.S.; RAMA RAO, S. *In vitro* propagation of *Allium tuberosum* Rotl. ex. Spreng by shoot proliferation. **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 375-378, 1992.
- PEREIRA, T.S.; ANDRADE, A.C. de S. Germinação de *Psidium guajava* L. e *Passiflora edulis* Sims. Efeito da temperatura, substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, SP, v.16, n.1, p. 58-62, 1994.
- RUGINI, E.; VERMA, D. C. Micropropagation of difficult to propagate almond (*Prunus amygdalus*, Batsch) cultivar. **Plant Science Letters**, v. 28, p.273-281, 1982.
- RUGGIERO, C. Considerações gerais sobre a cultura no Brasil. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Maracujá**. Jaboticabal: Ed. L. Summa. 1987, 315p.
- SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4 ed. Belmont: Wadsworth, 1992, 682 p.
- SÃO JOSÉ, A. R. Maracujá, Produção e Mercado. Vitória da Conquista, BA. DFZ / UESB, 1994, 255 p.
- SCORZA, R., JANICK, J. Tissue culture in *Passiflora* L. **24 Annu. Congr. Amer. Soc. Hort. Sci. Trop. Reg.** p. 179-183, 1976.
- SCORZA, R., JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society Horticultural Science**, v. 105(6): 892-897, 1980.
- SILVA, M. B. **Transformação genética de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger) mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. Viçosa, MG: UFV, 1998. 45 p. Tese Mestrado.
- SKIRVIN, R.M; McPHEETERS, K. D; NORTON, M. Sources and frequency of somaclonal variation. **HortScience**, v. 29, p.1232-1237, 1994.
- TEIXEIRA, C. G. Cultura. In: ITAL - Campinas (Ed.) **Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas, 1994. p. 1-142.
- TSAY H. S.; HSU, J. Y.; YANG, T. P.; YANG, C. R. Anther culture of passionfruit (*Passiflora edulis*). **J. Res. Cuina**, v. 33, p. 126-131, 1984.
- VESTRI, F.; SCHIFF, S. & BENNICI, A. *In vitro* shoot regeneration in *Passiflora coerulea*. **Acta Horticulturae**, n. 280, p.105-107,1990.

ANEXOS

ANEXO 1. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PORCENTAGEM MÉDIA DE GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE MARACUJÁ AMARELO SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS.

Fonte de variação	G. L.	Quadrados Médios	F
Tratamentos	8	467,8	15,46 **
Erro	18	30,26	
Coeficiente de Variação (%)			35,51

* * significativo em nível de 1 % de probabilidade

ANEXO 2. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PORCENTAGEM MÉDIA DE EXPLANTE DE MARACUJAZEIRO AMARELO QUE PRODUZIRAM GEMAS APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM DIFERENTES MEIOS.

Fonte de Variação	G. L.	Quadrados Médios	F
Tratamento	3	2710,467	317,84 **
Erro	36	8,5278	
Coeficiente de Variação (%)			4,76

* * significativo em nível de 1 % de probabilidade

ANEXO 3. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO NÚMERO MÉDIO DE GEMAS DE MARACUJAZEIRO AMARELO PRODUZIDOS POR EXPLANTE CULTIVADOS EM DIFERENTES MEIOS.

Fonte de Variação	G. L.	Quadrados Médios	F
Tratamento	3	26,714	23,62 **
Erro	36	1,1309	
Coeficiente de Variação (%)			17,08

* * significativo em nível de 1 % de probabilidade

ANEXO 4. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO NÚMERO MÉDIO DE FOLHAS PRODUZIDAS NAS MICROESTACAS DE MARACUJAZEIRO AMARELO APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

Fonte de Variação	G. L.	Quadrados Médios	F
Tratamento	1	3,20	0,60 ^{ns}
Erro	18	4,8667	
Coeficiente de Variação (%)			40,85

^{ns} não significativo

ANEXO 5 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES PRODUZIDAS NAS MICROESTACAS DE MARACUJAZEIRO AMARELO APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

Fonte de Variação	G. L.	Quadrados Médios	F
Tratamento	1	1,80	0,43 ^{ns}
Erro	18	4,1778	
Coeficiente de Variação (%)			81,76

^{ns} não significativo

ANEXO 6. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE MURASHIGE & SKOOG (1962)

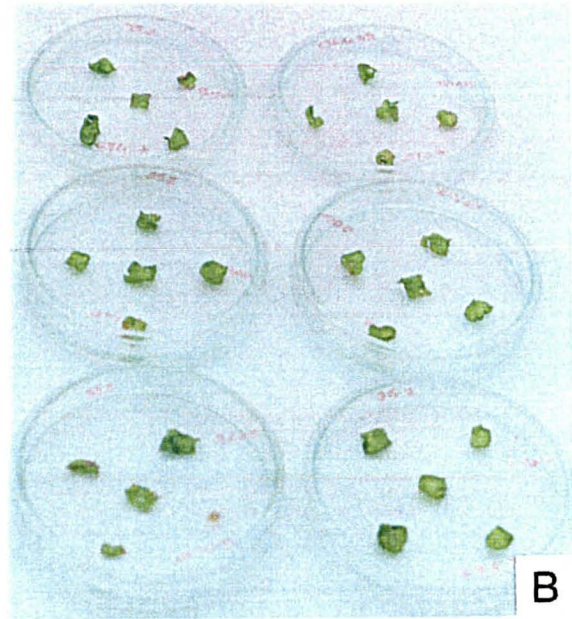
Componentes	Concentração (mg.L ⁻¹)
Macronutrientes	
NH ₃ NO ₂	1,650
KNO ₃	1,900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
	22,3
MnSO ₄ .H ₂ O	6,2
H ₃ BO ₃	8,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,83
KI	0,25
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	
Fe.EDTA	37,3
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	27,8
FeSO ₄ .7H ₂ O	
Mistura Orgânica	
Tiamina.HCl	0,1
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina.HCl	0,5
Glicina	2,0

FIGURAS

FIGURA 2. CULTURA DE TECIDOS A PARTIR DE PLANTA ADULTA DE MARACUJAZEIRO AMARELO COM 6 MESES DE IDADE. A) PLANTAS MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO; B) ENSAIOS DE REGENERAÇÃO A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES; C) MICROESTAQUIA DE MATERIAL ADULTO EM MEIO MS/2 SEM AUXINA; D) ENRAIZAMENTO DAS MICROESTACAS EM MEIO MS/2 COM 3 mg.L^{-1} DE AIB E $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ DE ANA.



A



B



C



D

FIGURA 3. CULTURA DE TECIDOS DE MATERIAL JUVENIL DE MARACUJAZEIRO AMARELO. A) SEQUÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DE GEMAS *IN VITRO* EM MEIO COM SAIS MS COM COMPLEXO VITAMÍNICO B₅ COM 2 mg.L⁻¹ DE BAP; B) DETALHE DAS PLÂNTULAS REGENERADAS, RAÍZES EM DESENVOLVIMENTO EM MEIO MS/2; C) PLANTAS ACLIMATADAS EM SUBSTRATO COMPOSTO POR 1:1 SOLO E VERMICULITA.



FIGURA 4. MICROESTAQUIA COM MATERIAL JUVENIL DE MARACUJAZEIRO AMARELO; A) MICROESTACAS CULTIVADAS IN VITRO EM MEIO MS; B) ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO EM MEIO MS; C) MICROESTACAS ACLIMATADAS EM SUBSTRATO COMPOSTO POR 1:1 SOLO E VERMICULITA.

